Lezione 13

Legame antigene-anticorpo
Metodiche immunologiche

Dose antigene ed immunogenicità

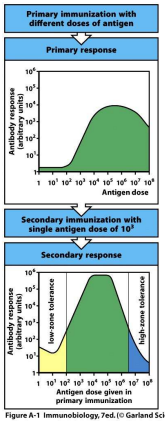


Figure A-1 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Immunogenicità delle proteine

Factors that influence the immunogenicity of proteins

Parameter	Increased immunogenicity	Decreased immunogenicity
Size	Large	Small (MW<2500)
Dose	Intermediate	High or low
Route	Subcutaneous > intraperitoneal > intravenous or intragastric	
Composition	Complex	Simple
Form	Particulate	Soluble
	Denatured	Native
Similarity to self protein	Multiple differences	Few differences
Adjuvants	Slow release	Rapid release
	Bacteria	No bacteria
Interaction with host MHC	Effective	Ineffective

Figure A-2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Adiuvanti comuni e modalità di azione

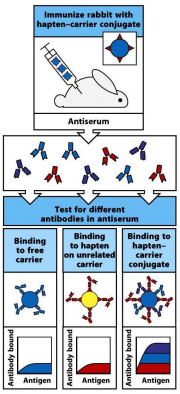
Adjuvants that enhance immune responses

Adjuvant name	Composition	Mechanism of action
Incomplete Freund's adjuvant	Oil-in-water emulsion	Delayed release of antigen; enhanced uptake by macrophages
Complete Freund's adjuvant	Oil-in-water emulsion with dead mycobacteria	Delayed release of antigen; enhanced uptake by macrophages; induction of co-stimulators in macrophages
Freund's adjuvant with MDP	Oil-in-water emulsion with muramyldipeptide (MDP), a constituent of mycobacteria	Similar to complete Freund's adjuvant
Alum (aluminum hydroxide)	Aluminum hydroxide gel	Delayed release of antigen; enhanced macrophage uptake
Alum plus *Bordetella pertussis*	Aluminum hydroxide gel with killed *B. pertussis*	Delayed release of antigen; enhanced uptake by macrophages; induction of co-stimulators
Immune stimulatory complexes (ISCOMs)	Matrix of Quil A containing viral proteins	Delivers antigen to cytosol; allows induction of cytotoxic T cells

DPT

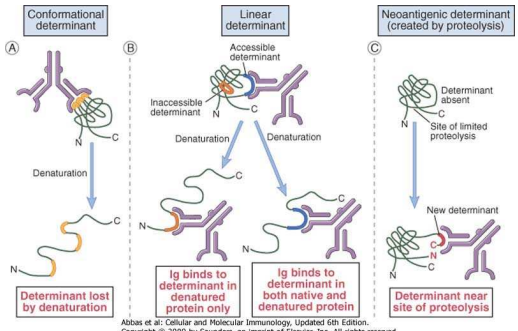
Figure A-4 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Aptene e carrier



Antigene diverso da Immunogeno

Epitopi lineari e conformazionali

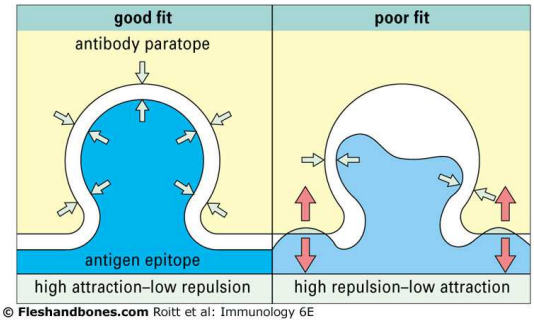


Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology, Updated 6th Edition.
Copyright © 2009 by Saunders, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved.

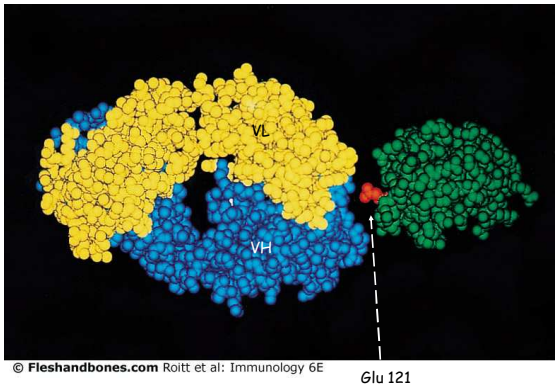
Specificità e cross-reattività degli anticorpi

radical (R)	sulphonate	arsonate	carboxylate
	tetrahedral	tetrahedral	planar
ortho	+ +	–	–
meta	+ + +	+	±
para	±	–	–

© **Fleshandbones.com** Roitt et al: Immunology 6E

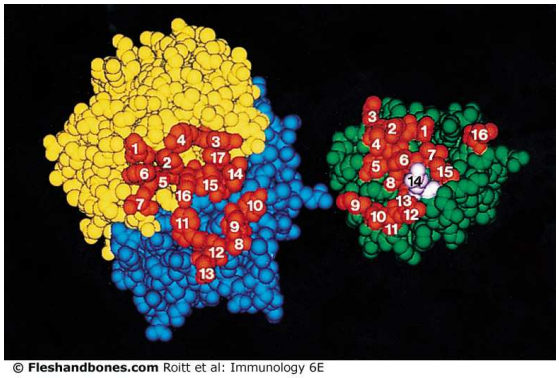


© **Fleshandbones.com** Roitt et al: Immunology 6E



© **Fleshandbones.com** Roitt et al: Immunology 6E

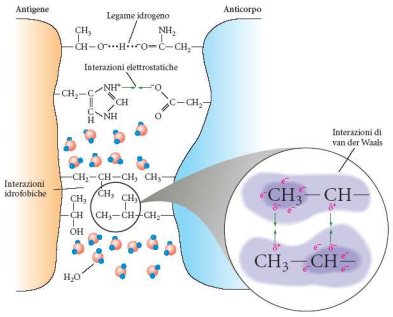
Glu 121



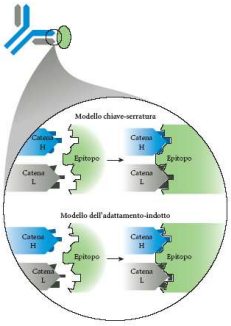
© **Fleshandbones.com** Roitt et al: Immunology 6E

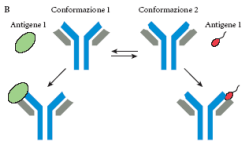
Forze chimiche su cui si basa interazione antigene-anticorpo

$1/d^2 - 1/d^7$

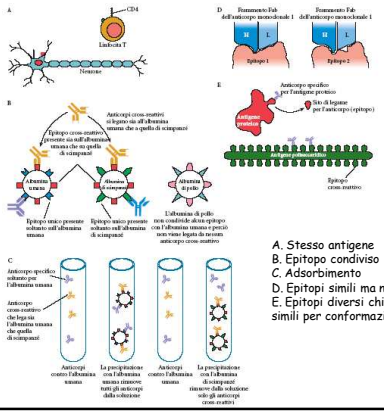


Modelli principali sull'interazione antigene-anticorpo





Cross-reattività degli anticorpi



A. Stesso antigene
B. Epitopo condiviso
C. Adsorbimento
D. Epitopi simili ma non identici
E. Epitopi diversi chimicamente ma simili per conformazione

Applicazione della cross-reattività
Mimetismo molecolare

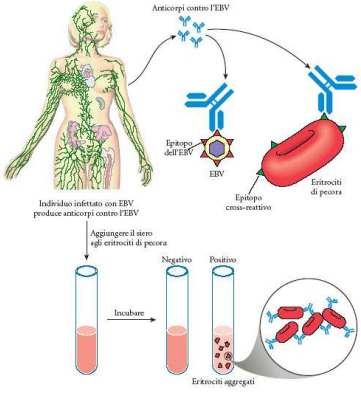
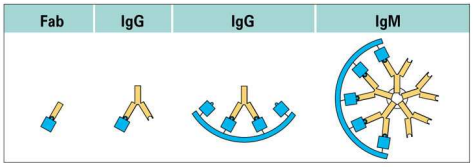


Figura 9.3 L'applicazione della cross-reattività come strumento diagnostico. Individui infettati con l'EBV producono anticorpi contro l'EBV che sono cross-reattivi con un antigene della superficie dei globuli rossi (RBC) di pecora. Perciò, se il siero da individui infettati da EBV viene mescolato con i globuli rossi di pecora (in basso), gli anticorpi contro l'EBV agglutineranno (o aggregheranno) i globuli rossi dando una reazione positiva.

Affinità, avidità, valenza



antibody	Fab	IgG	IgG	IgM
effective antibody valence	1	1	2	up to 10
antigen valence	1	1	n	n
equilibrium constant (L/M)	10^4	10^4	10^7	10^{11}
advantage of multivalence	–	–	10^3-fold	10^7-fold
definition of binding	affinity	affinity	avidity	avidity
	intrinsic affinity		functional affinity	

© **Fleshandbones.com** Roitt et al: Immunology 6E

Legame cooperativo

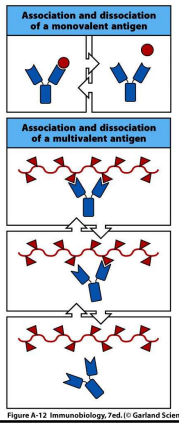


Figure A-12 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

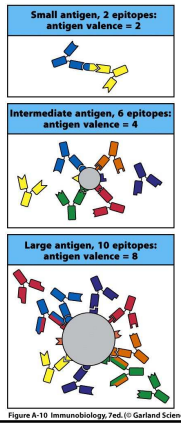
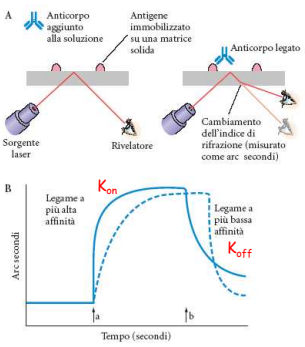


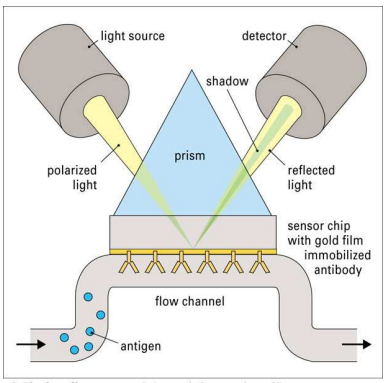
Figure A-10 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Calcolo delle costanti cinetiche mediante risonanza plasmonica di superficie

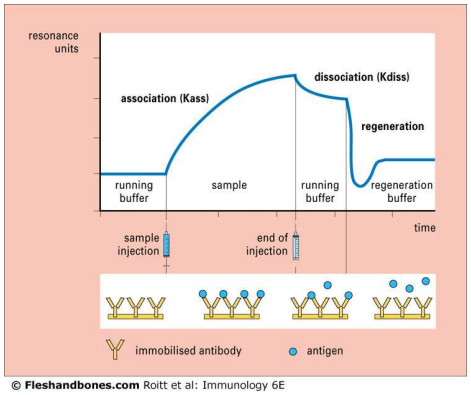
Figura 9.4 L'uso di un biosensore per la misura in tempo reale delle interazioni antigene-anticorpo. (A) L'antigene viene legato covalentemente alla superficie di un chip, e la soluzione di anticorpo viene aggiunta sulla superficie del chip. Intanto il raggio laser investe la superficie del chip dal fondo. Il legame o la dissociazione dell'anticorpo alla superficie del chip risulta in cambiamenti di massa sulla superficie, che alterano l'indice di rifrazione. Ciò cambia l'angolo del raggio riflesso, che può essere rilevato da un pannello di tubi fotomoltiplicatori (a destra). (B) La lettura di un campione con un biosensore in un ipotetico esperimento simile a quello illustrato nel pannello A. L'anticorpo viene aggiunto al tempo indicato dalla freccia marcata con "a", e l'evento di legame viene misurato nel tempo. Il cambiamento dell'indice di rifrazione della luce del laser viene misurata come uno spostamento nella distanza angolare della luce rifratta ed è riportato in arc secondi (60 arc secondi in un arc minuto; 60 arc minuti sono uguali a 1 grado su un cerchio di 360 gradi: 3,600 arc secondi/grado). Dopo un periodo che va da secondi a minuti, l'evento di legame è completo, e il cambiamento dell'indice di rifrazione si stabilizza. Se la soluzione di anticorpo viene quindi rimossa e il chip lavato usando una soluzione priva di anticorpo (il tempo è indicato con la freccia "b"), l'anticorpo che è già legato al chip si dissocierà. Gli anticorpi ad alta affinità si legano rapidamente (cambiamento rapido nell'indice di rifrazione), quelli a più bassa affinità si legano lentamente. Similmente, gli anticorpi con una costante di dissociazione bassa rimangono legati all'antigene e vengono rimossi lentamente con un cambiamento più lento dell'indice di rifrazione, mentre gli anticorpi che vengono lavati via rapidamente dall'antigene hanno una costante di dissociazione elevata e una diminuzione dell'indice di rifrazione più rapida.



Plasmon resonance



© **Fleshandbones.com** Roitt et al: Immunology 6E



© **Fleshandbones.com** Roitt et al: Immunology 6E

Applicazione della plasmon resonance: calcolo affinità TCR

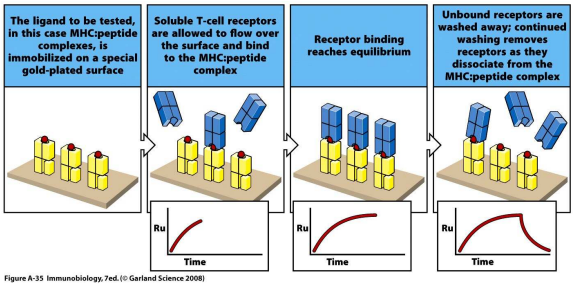
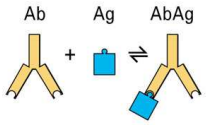


Figure A-35 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

According to the law of mass action, the ratio of k_{off} to k_{on} is the K_A of receptor binding:
$K_A = 1/K_D = k_{on} / k_{off}$.
The units are consistent: k_{off} is in units of min^{-1}; k_{on} is in units of $M^{-1}min^{-1}$, so K_A is in units of M.
If binding follows the law of mass action, the K_d calculated this way should be the same as the K_d calculated from a saturation binding curve.

antigen–antibody reactions are reversible

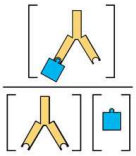


applying the Law of Mass Action

equilibrium constant or affinity, K, is given by

K_A

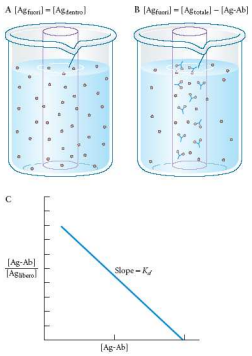
$$K = \frac{[AbAg]}{[Ab]\,[Ag]}$$



© **Fleshandbones.com** Roitt et al: Immunology 6E

Dialisi all'equilibrio per il calcolo dell'affinità

Figura 9.5 La dialisi all'equilibrio per misurare l'affinità dell'anticorpo. (A) Un piccolo antigene può diffondere liberamente all'interno e all'esterno di un tubo da dialisi costituito da una membrana semipermeabile, per cui la concentrazione dell'antigene raggiunge eventualmente l'equilibrio su entrambi i lati della membrana. (B) Se le molecole anticorpali sono poste all'interno del tubo, gli anticorpi essendo grandi molecole non possono diffondere attraverso la membrana da dialisi. L'affinità dell'anticorpo per l'antigene viene calcolata in base alla quantità di antigene che è rimasta all'interno del tubo ed è paragonabile alla concentrazione dell'antigene libero all'esterno. Se l'antigene viene rivelato mediante una marcatura radioattiva dello stesso, si può misurare la quantità di antigene libero all'esterno della membrana. Assumendo che la concentrazione dell'antigene libero all'interno della membrana eguaglia la concentrazione dell'antigene libero all'esterno della membrana, qualsiasi radioattività addizionale all'interno della membrana rappresenta la quantità di antigene legato, ovvero la quantità di antigene complessato all'anticorpo (Ag – Ab). (C) Questi dati possono essere trasformati mediante l'equazione di Scatchard che permette di stimare l'affinità di un anticorpo per il suo antigene. Se il valore di [Ag – Ab]/[Ag_{libero}] (la concentrazione dei complessi antigene-anticorpo diviso la concentrazione dell'antigene libero) viene posta su grafico in funzione della [Ag – Ab] (la concentrazione dei complessi antigene-anticorpo), la pendenza della curva corrisponde a K_d (la costante di dissociazione).



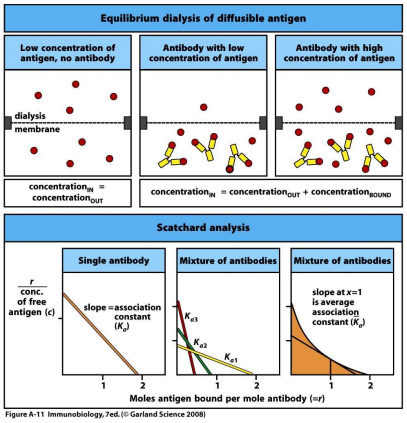
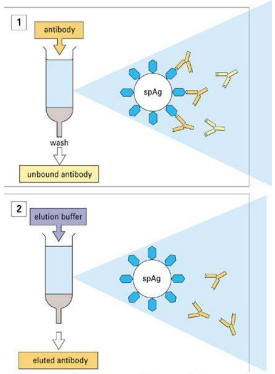


Figure A-11 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Cromatografia di affinità per isolare anticorpi con unica specificità



© **Fleshandbones.com** Roitt et al: Immunology 6

Gli anticorpi monoclonali

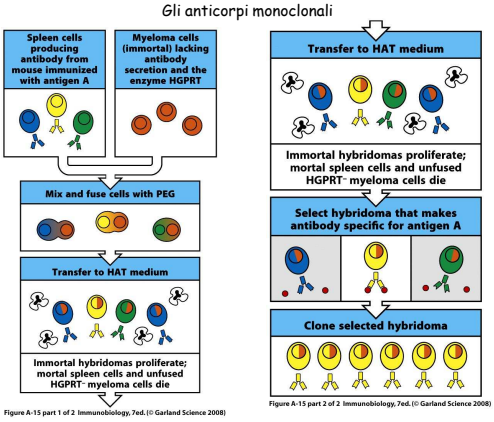


Figure A-15 part 1 of 2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

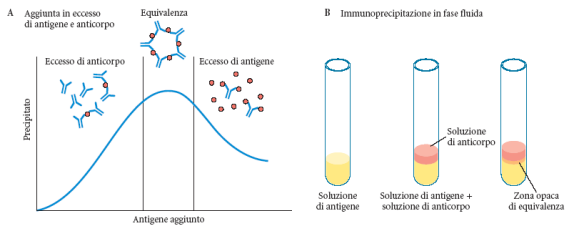
Figure A-15 part 2 of 2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

HAT= ipoxantina, aminopterina e timidina

HGPRT= ipoxantina-guanina fosforibosil transferasi

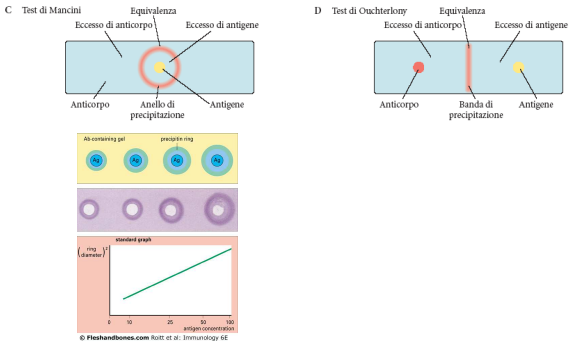
- Reazioni anticorpali primarie
- Reazioni anticorpali secondarie
- Titolo antisiero

Immunoprecipitazione in fase fluida



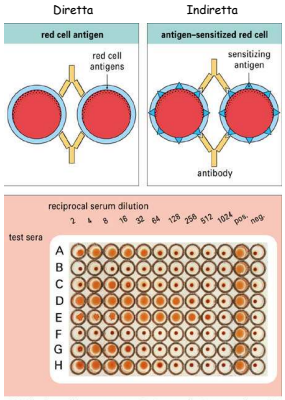
Immunocomplessi= complessi antigene-anticorpo

Immunoprecipitazione su fase solida



© Fleshandbones.com Roitt et al.: Immunology 6E

Agglutinazione



© Fleshandbones.com Roitt et al: Immunology 6E

Sistema gruppo ematico ABO

Serum from individuals of type	Red blood cells from individuals of type: O	A	B	AB
	Express the carbohydrate structures			
	R–GlcNAc–Gal ↑ Fuc	R–GlcNAc–Gal–GalNAc ↑ Fuc	R–GlcNAc–Gal–Gal ↑ Fuc	R–GlcNAc–Gal–GalNAc ↑ Fuc ↑ R–GlcNAc–Gal–Gal ↑ Fuc
O Anti-A and anti-B antibodies	no agglutination	agglutination	agglutination	agglutination
A Anti-B antibodies	no agglutination	no agglutination	agglutination	agglutination
B Anti-A antibodies	no agglutination	agglutination	no agglutination	agglutination
AB No antibodies to A or B	no agglutination	no agglutination	no agglutination	no agglutination

Figure A-8 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Sistema gruppo ematico Rhesus e test di Coombs

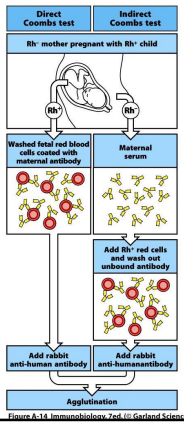
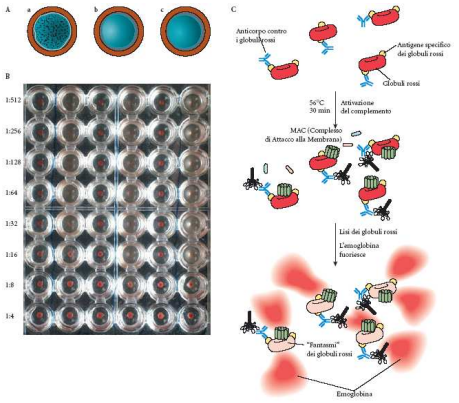
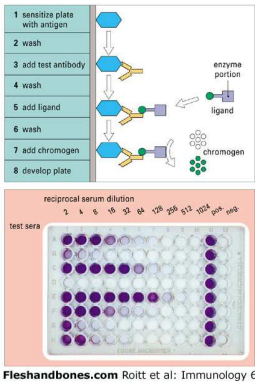


Figure A-14 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Test di inibizione dell'agglutinazione e fissazione del complemento

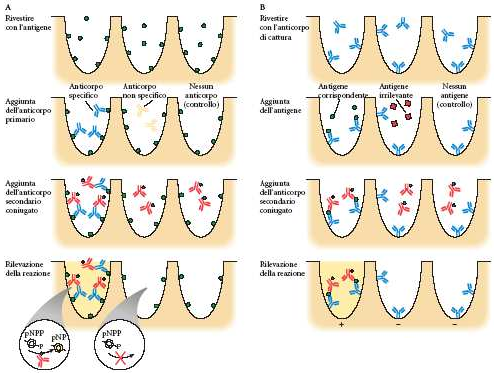


ELISA, saggio immunoenzimatico (enzyme-linked immunosorbent assay)



© **Fleshandbones.com** Roitt et al: Immunology 6

ELISA diretto — ELISA a sandwich



RIA, saggio radioimmunologico

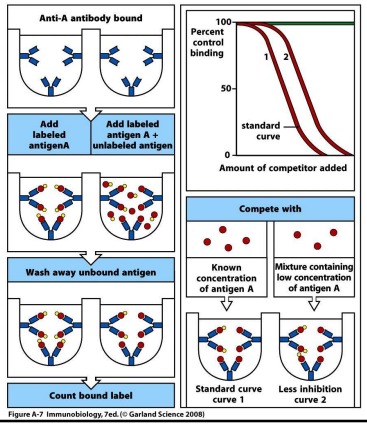
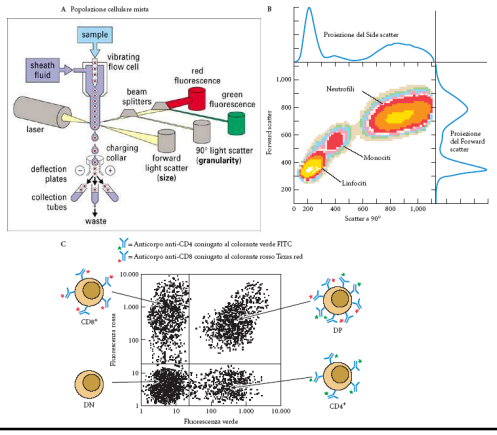


Figure A-7 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

FACS separatore di cellule attivato da fluorescenza



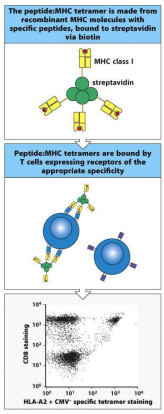
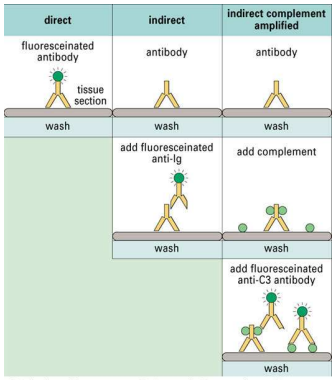


Figure A.33 Janeway's Immunobiology, 8ed. (© Garland Science 2012)

Tetrameri (pentameri) MHC per visualizzare linfociti T antigene-specifici

Immunofluorescenza diretta ed indiretta



© Fleshandbones.com Roitt et al: Immunology 6E

Immunofluorescenza ed immunomicroscopia elettronica

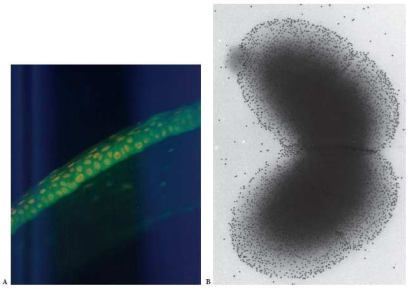
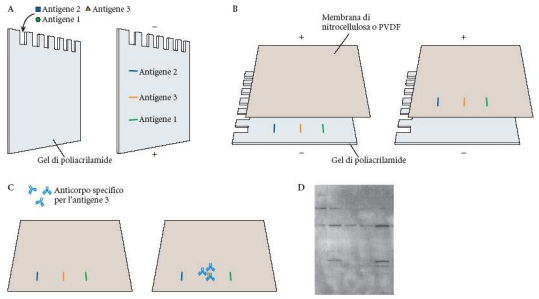


Figura 9.14 L'uso di anticorpi per la rivelazione di antigeni in microscopia. (**A**) L'immunoistochimica a fluorescenza permette di rilevare antigeni mediante la microscopia a fluorescenza. In questo caso, l'antigene d'interesse (una proteina di un canale ionico) viene rilevato sull'epitelio con l'uso di un anticorpo covalentemente coniugato alla sonda verde fluorescente di fluoresceina. (**B**) In microscopia elettronica gli antigeni sono legati da anticorpi covalentemente coniugati a particelle d'oro. L'anticorpo primario è in questo esempio diretto contro il polisaccaride capsulare o di superficie del batterio (*Enterococcus faecalis*) e il legame di questo anticorpo IgG viene rilevato dall'aggiunta della proteina A (una proteina che lega le IgG) coniugata a particelle d'oro di 20 nanometri.

Immunoblot o Western blot



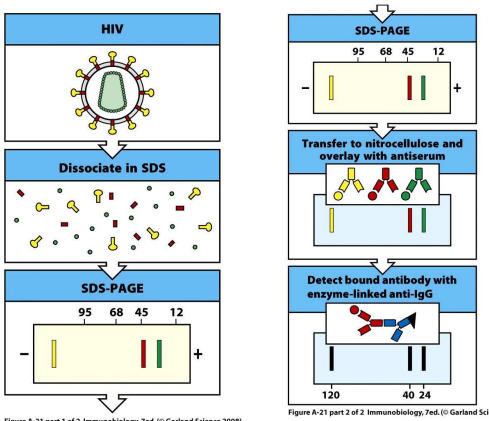


Figure A-21 part 1 of 2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Figure A-21 part 2 of 2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)